

## 製品データ: 106

## BEACON® 2000 Fluorescence Polarization System によるヘマトポルフィリン IX 親和性 DNA アプタマーの結合能評価

2004年1月

 データの提供: 大阪大学・大学院工学研究科・応用生物学専攻  
 岡澤敦司先生、片倉啓雄先生  
 福崎英一郎先生、小林昭雄先生

## 1. 実験概要

*in vitro* selection によって取得したヘマトポルフィリン IX (HPIX) に親和性を有する DNA アプタマーの結合能を BEACON® 2000 Fluorescence Polarization System (Invitrogen) を用いて蛍光偏向法によって定量した。

## 2. 実験方法

## (1) DNA アプタマー

EAH Sepharose 4B に固定化した HPIX をターゲットとし、59 塩基のランダム配列を有する DNA プールから 10 ラウンドの *in vitro* selection によって選択された配列およびその部分配列を用いた。

- A. 5'-CAA TGG GGT CGG GCG GGC CGG GTG TCA TGG TGG ACG GAG ATG GGA CGT AGA GGG CGG T-3'
- B. 5'-ATG GGG TCG GGC GGG CCG GGT GT-3' (A. の 5' 側下線部)
- C. 5'-ATG GTG GAC GGA GAT GGG ACG TA-3' (A. の 3' 側下線部)

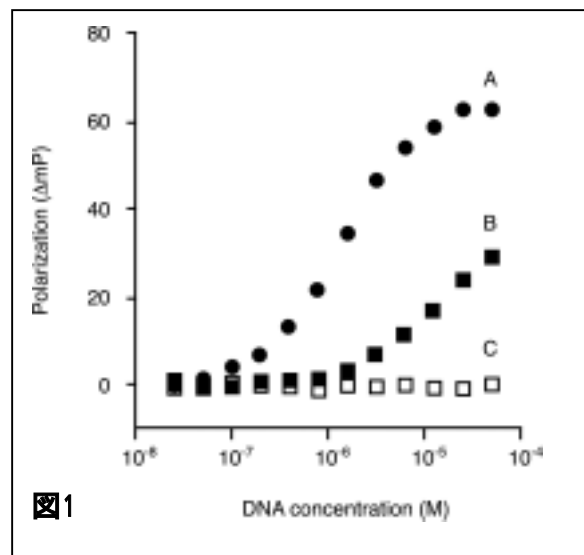
## (2) 結合定数の測定

各 DNA アプタマー (50 μM) をバッファー (100 mM トリス酢酸 pH 8.0, 200 mM 酢酸ナトリウム, 50 mM 酢酸カリウム, 25 mM 酢酸マグネシウム, 5% ジオキサン) 中で 5 分間、95°C で変性させた後、ゆっくりと室温に戻すことによってリフォールディングさせた。この DNA アプタマー溶液を各測定濃度 (50 μM ~ 0.1 nM) に希釈し、HPIX (1 μM) を加えた。混合液を 30 分間室温でインキュベートした後に、BEACON® 2000 Fluorescence Polarization System を用いて HPIX の蛍光偏向 (Ex. 390 nm、Em. 620 nm) を測定した。

## 3. 結果考察

図 1 に各 DNA アプタマーと HPIX の結合による蛍光偏向度の変化量 (mP) を示した。DNA アプタマー A および B は濃度依存的に HPIX の蛍光偏向度を増加させた。このシグモイド曲線から非線形回帰分析によって各 DNA アプタマーの解離定数  $K_d$  を求めたところ、A:  $1.6 \times 10^6$  M, B:  $1.5 \times 10^5$  M という値を得た。以上の結果から、DNA アプタマー A と HPIX の結合部位はより G 含量の高い B 配列中に存在し、C 配列は構造の安定化などの要因により DNA アプタマー A と HPIX の結合を強めていることが示唆された。

参考) Okazawa, A., *et al.*, *In vitro* selection of hematoporphyrin binding DNA aptamers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10** (2000) 2653



## 製品情報

製品名	カタログ番号	サイズ	価格 (¥)
BEACON® 2000	P2300	1式	3,850,000
Full-Range BEACON® 2000	P2370	1式	6,800,000

他の当社製品の国内製品使用データは当社 WEB サイト: [http://www.invitrogen.co.jp/tech/kokunai\\_data.shtml](http://www.invitrogen.co.jp/tech/kokunai_data.shtml) または日経 BP 社 Biotechnology JAPAN: <http://biotech.nikkeibp.co.jp/netlink/ito/data/> にてご覧いただけます。

2004.1.26

## インビトロジェン株式会社

本社 〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-35-4 日本橋浜町パークビル  
**カスタマーサービス** TEL (03)3663-7974 FAX (03)3663-7975  
 カスタムプライマーについて TEL (03)3663-8378 FAX (03)3663-8242  
 営業部 (CB) へのお問い合わせ TEL (03)3663-8082 FAX (03)3663-8246  
 大阪営業所 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町 1-21 エサカ中央ビル 4F  
 TEL (06)6339-8165 FAX (06)6339-8138  
 配送センター 〒166-0013 東京都杉並区堀の内 1-8-26 (株)トーシン内  
 TEL (03)3318-8521 FAX (03)3318-8523

販売店